



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO FARMÁCIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Genil Dantas de Oliveira

Caracterização química e avaliação da atividade antimicrobiana do Óleo Essencial e de microemulsões produzidas a partir de *Croton conduplicatus* Knuth

Campina Grande

2022

Genil Dantas de Oliveira

Caracterização química e avaliação da atividade antimicrobiana do Óleo Essencial e de microemulsões produzidas a partir de *Croton conduplicatus* Knuth.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à coordenação do curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Área de concentração:
Fitoquímica.

Orientador: Prof. Dr. Harley da Silva Alves

Campina Grande

2022

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

O48c Oliveira, Genil Dantas de.
Caracterização química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e de microemulsões produzidas a partir de *Croton Conduplicatus* Knuth [manuscrito] / Genil Dantas de Oliveira. - 2022.
39 p.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2022.

"Orientação : Prof. Dr. Harley da Silva Alves ,
Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Eucaliptol. 3. Medicina popular. I. Título

21. ed. CDD 615.532

GENIL DANTAS DE OLIVEIRA

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, FORMULAÇÃO DE SISTEMA MICROEMULSIONADO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *CROTON CONDUPPLICATUS* KNUTH.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à coordenação do curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Área de concentração: Fitoquímica

Aprovada em: 28/03/2022

BANCA EXAMINADORA

Harley da Silva Alves

Prof. Dr. Harley da Silva Alves (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

João Augusto Oshiro Júnior

Prof. Dr. João Augusto Oshiro Júnior
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Maricelma Ribeiro Morais

Profa. Dra. Maricelma Ribeiro Morais
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Dedico este trabalho a minha querida
mãe, a qual me apoiou infinitamente nesta
longa jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais, Maria Lêda de Oliveira Dantas por todo amor, carinho, incentivos, por sempre me guiar e me apoiar em todos momentos difíceis, por me acolherem e cuidarem de mim durante toda minha trajetória.

Agradeço também ao meu orientador, Harley da Silva Alves por toda compreensão, tempo, dedicação e por todos ensinamentos e orientações sempre precisas e necessárias durante esses quatro anos.

Aos demais que já fizeram parte do grupo Lafit- UEPB durante minha estadia: Antônio Carlos, Tiago Marinho, Karla Menezes, Adriana Caneiro, Renally Lucena, Sara Efigênia, Adrielle Lima, Kelly Jaiane e Helimarcos Nunes. Em especial, Geovana Guedes, por todos ensinamentos e paciência.

Aos meus colegas de classe da turma 2016.2 e aos membros da coordenação de do curso de farmácia da UEPB.

A Naara Felipe da Fonsêca, meu amor, sem você este trabalho e este momento não seriam possíveis. Obrigado por sempre pegar na minha mão e estar comigo em todos os momentos. Te amo.

A UEPB e a todos profissionais que estiveram envolvidos no meu processo de formação acadêmica.

A todos meus amigos e colegas que fizeram parte dessa jornada difícil e divertida.

RESUMO

Croton conduplicatus, conhecida popularmente como “quebra-faca”, é uma planta endêmica da caatinga brasileira, produtora de óleos essenciais que é empregada na medicina popular para o tratamento de dores de cabeça, gripe, dores estomacais e indigestão. Visando obter novas informações sobre esse óleo essencial, o presente trabalho teve como objetivo produzir e identificar os compostos químicos presentes no óleo essencial (O.E) das folhas, desenvolver um sistema microemulsionado e avaliar a atividade microbiológica de ambos. A planta foi coletada no município de Irecê, Bahia. As suas folhas foram desidratadas em estufa de circulação de ar por 72h (45 °C) e submetida a pulverização em moinho de facas fornecendo 704,2 g da droga vegetal. Em seguida, foi submetida a hidrodestilação utilizando aparato de *Clevenger* por 3h, possibilitando a obtenção do óleo essencial de *C. conduplicatus* (OECC) que teve sua composição química avaliada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS). As microemulsões foram elaboradas utilizando Água Deionizada como fase aquosa, Triglicérides do Ácido Caprílico e Cáprico (TACC ®) como fase oleosa, Kolliphor HS-15 ® como surfactante, Transcutol P ® como co-surfactante e o O.E do *C.conduplicatus* como princípio ativo em concentrações variadas de 5%, 4%, 3% e 2%. Foram realizados os ensaios para a obtenção do Potencial Zeta (P.Z), Índice de Polidispersão (I.P.D), Tamanho de Gotícula (T.G) e Condutividade elétrica. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de cavidade-poço e também pela microdiluição em caldo frente à cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 33951, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Candida albicans* ATCC90028. Com o procedimento de hidrodestilação foi possível a obtenção de 2,2 mL do O.E, que foi avaliado via CG-MS e com isso foi possível a identificação de 71 compostos. As microemulsões formuladas apresentaram valores de P.Z aceitáveis, tamanho de gotículas variáveis entre 15 e 18 nm, I.P.D próximo à 0 e condutividade elétrica alta.. Os resultados apontaram para concentração inibitória mínima de 256 µg/mL para cepa de *S.aureus* ATCC 25923 e uma concentração bactericida mínima de 512 µg/mL. Além disso, foi observado que as microemulsões formuladas apresentaram atividade contra a mesma cepa de *S. aureus*. É possível concluir que o OECC teve a maioria dos seus constituintes identificados, que foi possível elaborar e caracterizar um sistema microemulsionado e que tanto o OECC quanto as microemulsões apresentaram atividade inibitória significativa frente a cepa bacteriana de *S.aureus* ATCC 25923.

Termos de indexação: Quebra-faca; Eucalipto1; *Staphylococcus aureus*; Microemulsão

ABSTRACT

Croton conduplicatus, popularly known as "quebra-faca", is an endemic plant of the Brazilian caatinga, producer of essential oils that is employed in folk medicine for the treatment of headaches, flu, stomach pains and indigestion. Aiming to obtain new information about this essential oil, the present work had as objective to produce and identify the chemical compounds present in the essential oil (E.O.) from the leaves, develop a microemulsified system and evaluate the microbiological activity of both. The plant was collected in the municipality of Irecê, Bahia. Its leaves were dehydrated in an air circulating oven for 72h (45 °C) and submitted to pulverization in a knife mill providing 704.2 g of the plant drug. Then, it was submitted to hydrodistillation using Clevenger apparatus for 3h, allowing the obtaining of the essential oil of *C. conduplicatus* (OECC) that had its chemical composition evaluated by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The microemulsions were prepared using Deionized Water as aqueous phase, Caprylic and Capric Acid Triglycerides (TACC ®) as oil phase, Kolliphor HS-15 ® as surfactant, Transcutol P ® as co-surfactant and the O.E. of *C. conduplicatus* as active ingredient in varying concentrations of 5%, 4%, 3% and 2%. The assays for obtaining Zeta Potential (P.Z), Polydispersity Index (I.P.D), Droplet Size (T.G) and electrical conductivity were performed. The antimicrobial activity was evaluated by the well-cavity method and also by broth microdilution against the strains *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 33951, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Candida albicans* ATCC90028. With the hydrodistillation procedure it was possible to obtain 2.2 mL of the O.E, which was evaluated via GC-MS and with this it was possible to identify 71 compounds. The formulated microemulsions presented acceptable P.Z values, variable droplet size between 15 and 18 nm, I.P.D near 0 and high electrical conductivity. The results pointed to a minimum inhibitory concentration of 256 µg/mL for *S.aureus* strain ATCC 25923 and a minimum bactericidal concentration of 512 µg/mL. Furthermore, it was observed that the formulated microemulsions showed activity against the same *S. aureus* strain. It is possible to conclude that the OECC had most of its constituents identified, that it was possible to elaborate and characterize a microemulsified system and that both the OECC and the microemulsions presented significant inhibitory activity against the bacterial strain of *S.aureus* ATCC 25923

Keywords: Quebra Faca; Eucalyptol; *Staphylococcus aureus*

Sumário

1-INTRODUÇÃO	9
2. REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1-Família <i>Euphorbiaceae</i>	11
2.2- O Gênero <i>Croton</i>	11
2.3- <i>Croton Conduplicatus</i>	13
2.4- Óleos Essenciais	14
2.5- Microemulsões	15
2.6- Atividade Antimicrobiana.....	16
3-METODOLOGIA	19
3.1- Identificação e coleta do material vegetal	19
3.2- Obtenção da droga vegetal	19
3.3- Extração do óleo essencial	19
3.4- Análise da composição química do OECC por cromatografia gasosa e espectrometria de massas	19
3.5- Elaboração das microemulsões.....	20
3.6- Determinação dos parâmetros físico-químicos.....	20
3.6.1- Determinação de potencial zeta, índice de polidispersão e tamanho de gotícula.	20
3.6.2- Valores de condutividade elétrica.	21
3.7- Atividade Antimicrobiana.....	21
3.7.1- Produtos testados e antimicrobianos.....	21
3.7.2- Meios de cultura	21
3.7.3-Microorganismos	21
3.7.4-Padronização do inóculo.....	22
3.7.5-Atividade Antimicrobiana por cavidade-poço.	22
3.7.6- Atividade antimicrobiana por microdiluição em caldo – Determinação da Concentração inibitória mínima e Concentração bactericida/fungicida mínima.	22
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1- Identificação dos constituintes químicos de <i>C. conduplicatus</i>	24
4.2- Determinação de potencial Zeta, índice de polidispersão e tamanho de gotícula.	26
4.3- Valores de condutividade elétrica.....	27

4.4- Atividade antimicrobiana	28
4.4.1-Atividade antimicrobiana por cavidade- poço.....	28
4.4.2- Atividade antimicrobiana por microdiluição em caldo – Determinação da Concentração inibitória mínima e Concentração bactericida/fungicida mínima	28
5-CONCLUSÃO	31
6- REFERÊNCIAS:	32

1-INTRODUÇÃO

A humanidade sempre sofreu com infecções bacterianas e fúngicas. Na última década, pôde-se perceber um aumento significativo desses microrganismos que apresentam patogenicidade, e de maneira mais preocupante resistências aos antibióticos empregados na terapia convencional. Em 2019 a organização mundial de Saúde (OMS) declarou que a morte de seres humanos por microrganismos resistentes estava entre as 10 maiores taxas de mortalidade. (WHO, 2019)

Estima-se que nesse mesmo ano 4,95 milhões de mortes podem ser atribuídas a infecções causadas por cepas bacterianas resistentes aos medicamentos antimicrobianos. Os patógenos que mais causaram mortes foram cepas resistentes de *Escherichia coli*, seguida das cepas de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. (MURRAY *et al.*, 2021)

A busca por produtos naturais para a cura de males sempre foi presente na história. A natureza apresenta uma fonte inextinguível de compostos químicos, que podem apresentar ações surpreendentes, em especial contra cepas de microrganismos. Devido ao aumento da resistência bacteriana, uma maneira de combater essa situação é a obtenção de compostos bioativos que apresentem eficácia contra essas bactérias. (AMINOV, 2018; SHIN *et al.*, 2018)

Os óleos essenciais (O.E) apresentam atividade antimicrobiana e isso se deve ao fato de serem compostos por terpenóides e por derivados de fenilpropanóides. Esses metabólitos são utilizados pela planta para fins de defesa contra predadores e microrganismos, inclusive os que apresentam patogenicidade ao ser humano (BAKALI, *et al.*, 2008).

Óleos essenciais são presentes em plantas do gênero *Croton*, e podem apresentar atividade microbiológica. Em estudo *in vitro*, Barbosa (2021) evidenciou a atividade antimicrobiana do O.E de *Croton urticifolius* frente a cepas de *S. aureus* e *E. coli*. O O.E proveniente das folhas de *C. Tetradenius* e *C. pulegiodoris* apresentaram capacidade inibir crescimento e provocar morte de isolados clínicos de *S. aureus*. (ROCHA *et al.*, 2021)

Além da busca por novos antimicrobianos, o uso de novas formulações farmacêuticas objetiva otimizar aspectos relacionados aos medicamentos. Como exemplos, a melhora na taxa de absorção, diminuição da excreção, aumento da biodisponibilidade, melhoria da estabilidade dos fármacos, entre outros. Neste contexto, as microemulsões apresentam-se como fortes candidatos à terapia antimicrobiana, podendo otimizar a ação desses fármacos. (JAIN, MEHIRA, JAIN, 2015)

Em virtude do crescente número de microrganismos resistentes, e visando colaborar com os saberes quimiotaxonômicos do gênero *Croton*, o presente estudo objetivou a caracterização química do óleo essencial de *C. conduplicatus* (OECC), formulação de sistemas microemulsionados, utilizando esse óleo como princípio ativo e a avaliação da atividade antimicrobiana do OECC obtido e das microemulsões formuladas frente às cepas de bactérias Gram Negativas, Gram positivas e a uma levedura.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1-Família *Euphorbiaceae*.

A família *Euphorbiaceae* atualmente engloba cerca de 8000 espécies em aproximadamente 334 gêneros. Na América Latina é possível observar a presença mais de 2500 espécies distribuídas em 92 gêneros. Em território brasileiro já foram encontradas cerca de 1100 diferentes espécies, pertencentes a 72 gêneros. Tais espécies variam entre árvores, arbustos, ervas e trepadeiras dos mais diferentes tamanhos, e podendo apresentar a produção de um látex leitoso irritante. (TRINDADE *et al.*, 2014)

No Brasil existem cerca de 1000 espécies distribuídas em 65 gêneros, que apresentam um alto grau de endemismo. Plantas dessa família são avistadas com frequência na caatinga brasileira, cerca de 78 espécies são endêmicas desse bioma e são consideradas típicas em virtude de sua boa adaptação as condições específicas do ambiente. (BRASIL, 2020; CORDEIRO *et al.*, 2015) A família *Euphorbiaceae* é considerada típica do bioma da caatinga, em virtude da sua extensão pelo semiárido nordestino, sendo cerca de 78 espécies endêmicas deste bioma (ZAPPI, 2008)

Vários exemplares dessa família são amplamente empregados na medicina popular e apresentam um grande valor socioeconômico e cultural como a *Hevea Aublet* (seringueira) em especial, no Brasil. Algumas “Euforbiáceas” são amplamente empregadas para fins alimentícios tanto humanos quanto animais, em virtude de sua fácil acessibilidade e de suas características nutricionais, por exemplo a *Manihot esculenta* Crantz, conhecida popularmente como mandioca. Devido a sua ampla gama de constituintes químicos que apresentam atividades biológicas, vários exemplares dessa família são muito empregadas na medicina popular desde os tempos antigos. (OLIVEIRA 2013; TRINDADE; LAMEIRA, 2018)

2.2- O Gênero *Croton*.

O gênero *Croton* é um dos mais importantes da família *Euphorbiaceae*, é englobado pela subfamília *Crotonoideae*, com cerca de 1200 espécies. No Brasil, cerca de 300 espécies podem ser encontradas nos mais diversos tipos de biomas e de vegetações (SECCO *et al.*, 2012). A maioria das espécies encontradas no Brasil são caracterizadas por possuírem látex em seus caules e são conhecidas popularmente como “marmeleiros” ou “velames”. (OLIVEIRA-TINTINO *et al.*, 2018.)

Segundo GUERRA-JÚNIOR *et al.*, (2022) as espécies mais importantes da fauna de

“Crótons” brasileiros são *Croton cajucara*, *C. blanchetianus*, *C. celtidifolius* Baill., *C. palanostigma*, *C. schiedeanus* Schlecht., *C. zehntneri* Pax, *C. eluteria* Bennett., *C. lechleri*, *C. palanostigma*, *C. urucurana*, *C. malambo* Karst e *C. nepetaefolius* Baill, sendo amplamente empregados na medicina popular sob formas diferentes e para o combate de problemas de saúde variados. A tabela 1 evidencia as principais espécies de crótons, sua aplicação na medicina popular e sua endemicidade.

Tabela 1: principais espécies do gênero *Croton* no Brasil, Distribuição geográfica e uso na medicina popular

Espécies	Distribuição Geográfica	Uso na Medicina Popular
<i>C. blanchetianus</i> Baill	Região Nordeste	Infusão das folhas utilizada para distúrbios gastrointestinais, reumatismo e enxaqueca
<i>C. cajucara</i> Benth	Floresta Amazônica	Infusão das cascas, folhas e tronco é utilizada para o tratamento de diabetes, controle de colesterol,
<i>C. celtidifolius</i> Baill	Floresta Atlântica	A infusão das cascas é usada no tratamento de inflamações, leucemia e reumatismo
<i>C. Eluteria</i> (L) W. Wright	Região Norte	O pó das cascas é usado para combater diarreia, bronquite e febre.
<i>C. Lechleri</i> Müll.Arg	Floresta amazônica	Látex avermelhado utilizado para cura de ferimentos
<i>C. palanostigma</i> Klotzch	Floresta Atlântica	Seu látex é usado como antibiótico, para o tratamento de diarreia, úlcera gástrica, inflamação intestinal e câncer
<i>C. malambo</i> H.Karst	Região Noroeste da Floresta Amazônica	Infusão das cascas é usada para fins anestésicos
<i>C. urucurana</i> Baill	Região Centro- Oeste	Usado para fins curativos em comidas
<i>C. nepetaefolius</i> Baill	Cerrado Brasileiro	Decocto utilizado como antiflatulento
<i>C. schiedeanus</i> Schldl	Região Noroeste	Chá das folhas utilizado como anti-hipertensivo
<i>C. zehntneri</i> Pax & K. Hoffm.	Região Nordeste	Chá das folhas usado como sedativo

Fonte: (GUERRA-JÚNIOR *et al.*, 2022)

A diversidade de moléculas bioativas é extremamente alta, sendo possível encontrar flavonoides, alcaloides, triterpenos, diterpenos e derivados fenólicos. As plantas desse

gêneros são bastante conhecidas na literatura científica por serem grandes produtoras de óleos essenciais constituídos por monoterpenos e sesquiterpenos. O uso popular e as atividades biológicas que as plantas desse gênero podem apresentar são atribuídas a essas classes de metabólitos secundários. Entretanto, tornam-se necessários estudos científicos que confrontem os dados quimiotaxonômicos com os saberes referentes ao uso popular para justificar e melhor compreender as bioatividades provenientes das plantas do gênero (RAVANELLI *et al.*, 2016).

2.3 *Croton Conduplicatus*

A espécie *Croton conduplicatus* é uma planta que apresenta uma distribuição significativa ao longo da América do Sul, em especial, na região nordeste do Brasil, onde é conhecida popularmente como “Quebra-Faca” em virtude da resistência extremamente alta dos seus caules e galhos. O uso etnofarmacológico da planta limita-se a ingestão do decocto das folhas e caules para combate a dor de cabeça, dor de estômago, indigestão e gripe (CARTAXO *et al.*, 2011)

Em um estudo de prospecção fitoquímica foi possível observar qualitativamente a presença de flavonoides, taninos, xantonas, chalconas, terpenos e catequinas provenientes de um extrato etanólico das folhas de *C. conduplicatus*, que havia sido obtido por maceração. Esse extrato apresentou atividade antimicrobiana em um ensaio *in vitro* realizado pela técnica de microdiluição em caldo utilizando placas de 96 poços. Dentre as cepas testadas, foi possível estabelecer os valores da concentração inibitória mínima para as cepas de *E. coli* ATCC 25922 (64 µg/mL), *S. aureus* ATCC 25923 (128 µg/mL), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (256 µg/mL) e *C. albicans* 40006 (128 µg/mL). (PEREIRA, 2019)

O Óleo Essencial de “quebra-faca” obtido das folhas foi avaliado via CG-MS e foram identificados 42 compostos químicos, sendo eles mono e sesquiterpenos. Os componentes majoritários foram o Eucaliptol e o *p*-cimeno da classe dos monoterpenos, enquanto os sesquiterpenos majoritários foram o espatulenol e o óxido de cariofileno. Foi constatada a presença de atividade antinociceptiva em modelo *in vivo* frente a camundongos e foi constatada a participação de receptores opióides e muscarínicos revelada por estudos de *docking* molecular. Foi ainda avaliada a atividade ansiolítica e sedativa desse óleo essencial, que demonstrou-se presente. O fato dela ser revertida por flumazenil indica o possível envolvimento dos receptores GABA_A (OLIVEIRA-JÚNIOR, *et al.*, 2018). Em outro momento, Almeida *et al.*, (2019) avaliaram o potencial antioxidante do óleo essencial e

concluíram que ele possui atividade antioxidante, podendo atuar como sequestrador ou inibidor de radicais livres.

O óleo essencial proveniente das cascas do *C. conduplicatus* apresentaram ainda atividade antinociceptiva e foi constatado que o mecanismo de ação relaciona-se com os receptores de potássio sensíveis à ATP e receptores muscarínicos. (OLIVEIRA- JÚNIOR *et al.*, 2017)

2.4- Óleos Essenciais

Os óleos essenciais (OEs) são substâncias aromáticas produzidas por mais de 17.500 plantas aromáticas, sendo comuns a várias famílias vegetais, como: *Myrtaceae*, *Euphorbiaceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae* e *Asteraceae*. A depender da espécie, podem ser produzidos ou armazenados nas flores, folhas, em caules, rizomas, frutos, sementes e raízes

(REGNAULT-ROGER; VINCENT; ARNASON, 2012).

Os OEs são misturas complexas, caracterizadas por apresentarem os monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides como constituintes. Normalmente, percebe-se uma predominância quantitativa de substâncias de esqueleto terpenóide em relação aos fenilpropanóides. De modo geral, os OEs apresentam dois ou três compostos majoritários, que aparecem em concentrações entre 20 e 70% e normalmente são responsáveis pelas atividades biológicas apresentadas (BERNARDS, 2010; MÉRILLON, 2018).

Os OEs podem ser obtidos através de destilação, hidrodestilação, por maceração e prensagem a frio, extração por fluido supercrítico e a extração assistida por micro-ondas. O processo mais comum para a obtenção consiste em hidrodestilação utilizando um aparato de clewenger simples desenvolvido em meados de 1928. A grande vantagem desse processo é o alto grau de pureza do óleo obtido, uma vez que todos os outros componentes apolares de alta massa molecular não são extraídos, resultando apenas na obtenção dos componentes voláteis, como terpenos e alguns fenóis de massa molecular baixa e alta volatilidade (REGNAULTROGER; VINCENT; ARNASON, 2012).

Há um bom tempo a humanidade utiliza vegetais para a cura de enfermidades, sendo empregadas na medicina popular e fornecendo base para a formulação de novos estudos a respeito de suas propriedades medicinais, em especial das plantas aromáticas que apresentam em sua constituição os óleos essenciais (CASTRO, 2011).

Os óleos essenciais apresentam uma vasta gama de atividades farmacológicas, contemplando a atividade antiviral, antisséptica, anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, antiparasitária, hepatoprotetoras, antidepressiva, antioxidante, entre outras. Tais evidências

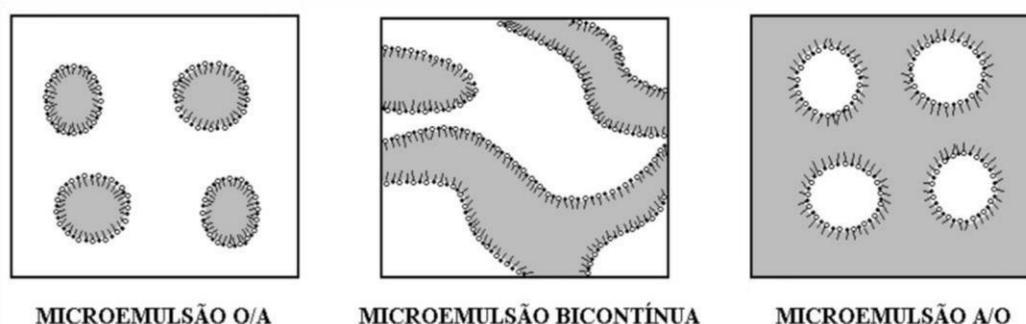
científicas ressaltam e fornecem subsídios para a busca acerca das bioatividades proporcionadas por esses metabólitos secundários (BURT, 2004; SHARIFI-RAD *et al.* 2017;BOUYAHYA *et al.*, 2020; JUGREET *et al.*, 2020)

2.5- Microemulsões

As microemulsões são uma forma farmacêutica que junto com lipossomas, nanoemulsões, dendímeros e nanopartículas se encaixam no grupo dos nanocarreadores. Esse grupo destaca-se de outros carreadores por apresentarem propriedades físico-químicas diferentes, podendo implicar em novas aplicações terapêuticas (MONTENEGRO *et al.*, 2016; MUKHERJEE *et al.*, 2015; JAIN, MEHRA, JAIN, 2015).

O termo microemulsão surgiu pela primeira vez em meados de 1959 e foi introduzida por Hoar e Schulmann. Trata-se de um sistema peculiar, que é formado através da mistura entre água, um componente oleoso (fase oleosa) e tensoativo (s), sua formação é espontânea quando esses componentes são misturados em proporções apropriadas. O sistema microemulsionado resultante normalmente apresenta translucidez isotrópica, estabilidade termodinâmica, tamanhos de gotículas variáveis entre 10 e 300 nm (Damasceno *et al.* , 2011). A figura 1 evidencia os tipos mais comuns de microemulsão existentes.

Figura 1: tipos de microemulsão: óleo em água (O/A), água em óleo (A/O) e as bicontínuas.



Fonte: Damasceno *et al.*, 2011.

As microemulsões O/A apresentam uma fase aquosa contínua, e as gotículas da fase oleosa encontram-se dispersas na fase aquosa e recobertas com os tensoativos utilizados. As gotículas presentes nesse sistema apresentam a região polar do tensoativo voltada para a fase aquosa, e a parte apolar voltada para fase gordurosa. Ao contrário das microemulsões O/A, as A/O apresentam como elemento dispersante uma fase oleosa, e gotículas polares dispersas nesse meio. Os tensoativos apresentam a camada lipofílica voltada para a fase

apolar, enquanto a porção polar do mesmo tensoativo direciona-se para o interior da gotícula, a qual está dispersa. (Gomes, 2010)

Em uma formulação bicontínua pode-se incorporar fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, isso se deve ao fato delas apresentarem uma rede formada por tubos aquosos em matriz oleosa e também uma rede de tubos oleosos em uma matriz aquosa. (Gomes, 2009)

Pode-se determinar o tipo de microemulsão levando em conta a proporção de óleo e água, os tipos de tensoativos utilizados e suas quantidades, a temperatura e ainda a presença de íons na fase aquosa. (JONSSON *et al.*, 1998).

A escolha do tensoativo é muito importante, ele pode ser utilizado puro ou em mistura com outros, objetivando a diminuição da tensão interfacial e resultando em uma formulação estável. Eles caracterizam-se por apresentarem uma natureza anfifílica, sendo caracterizados quimicamente por apresentarem uma região hidrofóbica outra uma hidrofílica, que pode ser aniônica, anfótera ou catiônica. (ROSSI *et al.*, 2007; NASCIMENTO, 2016).

Outro parâmetro que pode prever e guiar o tipo de microemulsão almejada é o Equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL). Os tensoativos que apresentam um EHL entre 3 e 9 tendem a formar microemulsões do tipo A/O, enquanto que os que apresentam valores entre 9 e 16 tendem a formar microemulsões O/A. Tensoativos com EHL maior que 16 são comumente empregados como solubilizantes. (BARROS, 2013)

2.6- Atividade Antimicrobiana

As infecções bacterianas causam a morte de seres humanos desde os primórdios da humanidade, sendo consideradas uma das principais causas de morte ao longo da história. O advento da descoberta dos antimicrobianos foi um marco histórico para o combate a esses microrganismos patogênicos e culminou em um aumento na expectativa de vida humana (CRUZ *et al.*, 2019).

Mesmo com a terapia antibiótica estabelecida é evidente no Brasil e em outros países do mundo preocupação constante de instituições públicas e privadas com esse problema. Em especial, em virtude do aumento do surgimento de cepas bacterianas que apresentam resistência aos agentes antimicrobianos empregados. Esses microrganismos apresentam mecanismos bioquímicos variados que conferem essa resistência. (FREITAS *et al.*, 2020; TAVARES *et al.*, 2020; SILVA & AQUINO, 2018)

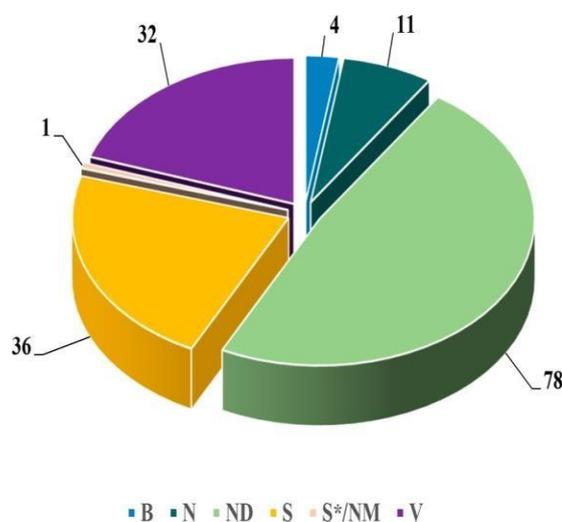
Uma gama de fatores está relacionada a esse tal aumento. Pode-se citar a escolha inadequada de fármacos para o tratamento de uma determinada infecção e o emprego de doses

subterapêuticas. Esses microrganismos que apresentam mecanismos de resistência já são encontrados inclusive em ambientes hospitalares e apresentam uma taxa crescente de resistência. (BROWN & WRITH, 2019). Essas bactérias são originadas de outros ambientes e podem ter genes que as conferem multirresistência. Além da diminuição da sensibilidade as bactérias frente aos antibióticos utilizados na terapia convencional, esses mecanismos podem permitir que os microrganismos resistam a condições ambientais desfavoráveis, e podem ainda contribuir para fatores de virulência regulação da homeostase bacteriana. (ABREU & MAZZAFERA, 2005).

Com esse problema em vista, a terapia antimicrobiana com novos fármacos, especialmente com aqueles originados de compostos naturais, torna-se uma alternativa promissora e interessante que precisa de novos estudos que evidenciem sua capacidade de inibir ou exterminar esses microorganismos patogênicos. (HERRMANN *et al.*, 2016)

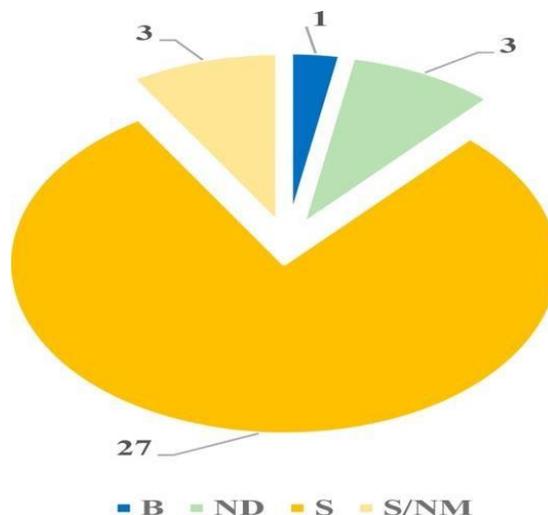
Entre primeiro de janeiro de 1981 e primeiro de janeiro de 2019 foram aprovados por órgãos de vigilância sanitária ao redor do mundo 162 novos agentes antibacterianos e 34 novos agentes antifúngicos. Dos novos agentes antibacterianos, 78 eram oriundos de produtos naturais como explicitado na figura 2, enquanto apenas 3 dos novos agentes antifúngicos eram derivados de produtos naturais, como pode ser visto na figura 3. (NEWMAN & CRAGG, 2020)

Figura 2: novos medicamentos aprovados para terapia antibacteriana ao redor do mundo entre janeiro de 1981 e janeiro de 2019.



Legenda: B: produtos biológicos; N: produtos naturais; ND: derivados de produtos naturais; S: sintéticos; S*/NM: sintéticos/ mimético de produto natural; V: vacina.

Figura 3: novos medicamentos aprovados para terapia antifúngica ao redor do mundo entre janeiro de 1981 e janeiro de 2019.



Legenda: B: produtos biológicos. ND: derivados de produtos naturais. S: sintéticos. S/NM: sintéticos/mimético de produto natural.

Num país como o Brasil, de dimensões continentais e onde a biodiversidade é a maior do planeta, há uma imensa probabilidade de encontrar novos compostos bioativos que apresentem mecanismos de ação inovadores contra cepas microbianas, em especial aquelas resistentes às terapias antibióticas convencionais. E não só isso, essas substâncias podem agir como adjuvantes terapêuticos, exibindo um potencial sinérgico com os medicamentos empregados na terapia antimicrobiana convencional. Por isso, existe um grande interesse na busca por produtos naturais com esse tipo de atividade (PRADEEPA, *et al.*, 2014; HERRMANN *et al.*, 2016)

3-Metodologia

3.1- Identificação e coleta do material vegetal

A coleta das partes aéreas de *C. conduplicatus* foi realizada no município de Irecê, Bahia, sob as coordenadas -11.345982 S, -41.891216 W, às 14:00 h do dia 04/02/2021, durante o período chuvoso. Para a identificação botânica apropriada do material vegetal coletado, uma excisata que foi depositada sob o número 3217 no Herbário Manoel de Arruda Câmara (ACAM).

3.2- Obtenção da droga vegetal

As folhas do *C. conduplicatus* foram separadas das demais partes aéreas e, em seguida, submetidas a secagem em estufa de circulação sob temperatura de 40° C durante um período de 72 horas. As folhas secas foram trituradas em moinho de facas com granulometria aproximada de 10 mesh, obtendo-se 704,5 g da droga vegetal (DV) armazenada em recipiente hermeticamente fechado e ao abrigo da luz.

3.3- Extração do óleo essencial

Para esta etapa, quantidade total da DV foi submetida ao processo de hidrodestilação utilizando o aparato de *Clevenger* por três horas. Para cada 100g da DV foram utilizados 709 mL de água destilada, quantidade necessária para cobri-la totalmente. Esse procedimento possibilitou a extração do Óleo Essencial de *C. conduplicatus* (OECC).

3.4- Análise da composição química do OECC por cromatografia gasosa e espectrometria de massas

Para a realização da cromatografia gasosa foi utilizado um cromatógrafo a gás Clarus 680 equipado com injetor automático, coluna Elite 5MS (30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm) e espectrômetro de massas Clarus SQ8S (Perkin Elmer, Massachusetts). Foi utilizado gás hélio como gás de arraste a um fluxo de 1 mL min⁻¹. O injetor foi aquecido a 250 °C. O forno iniciou seu gradiente de aquecimento em 35 °C (por 2 min) até 90 °C (por 2 min) a uma taxa de 10 °C p/min; 90 °C até 130 °C (por 4 min) a uma taxa de 8 °C p/min; 130 °C até 230 °C (por 2 min) a uma taxa de 4 °C p/min. O injetor trabalhou com split de 1:10 e 1,0 µL de amostra foram injetados. O tempo de análise foi de 45,50 minutos. O detector trabalhou em modo de ionização de elétrons (EI) a 70 eV, uma temperatura de interface de 180 °C (inlet line) e fonte (source temp) a 220 °C. A varredura de massas foi de 20-600 Da. As análises

foram realizadas em triplicata.

3.5- Elaboração das microemulsões.

Como fase oleosa foi selecionado os triglicerídeos do ácido caprílico e cáprico (TACC ®), Kolliphor HS15 (KHS15) foi utilizado como tensoativo, como co-tensoativo foi aplicado o Transcutol P ® (TCP), a fase aquosa foi composta de água deionizada e como ingrediente ativo da formulação foi utilizado o OECC em diferentes concentrações.

Os sistemas microemulsionados foram obtidos a partir da mistura em proporção definida de cada um dos componentes, como mostra a tabela 2. Em seguida, foram submetidas a agitação em desruptor de células ultrassônico com potência de 250 W por 1 minuto, e ao banho ultrassônico por 1 minuto. Após isso, foi possível obter as microemulsões de óleo essencial de *C.conduplicatus* nas concentrações de 5% (MOECC-5%), 4% (MOECC-4%), 3% (MOECC- 3%), 2% (MOECC-2%) e a microemulsão branca (MEB) que não apresentava óleo essencial.

Tabela 2: Proporção das matérias-primas utilizadas para a formulação da microemulsão

OECC	Água	KHS15 ®	TCP ®	TACC ®
MOECC-5%	52,01%	36,54%	4,06%	2,50%
MOECC-4%	53,10%	36,54%	4,06%	2,50%
MOECC-3%	54,10%	36,54%	4,06%	2,50%
MOECC-2%	55,10%	36,54%	4,06%	2,50%
MEB	57,10%	36,54%	4,06%	2,50%

Fonte: o autor.

3.6- Determinação dos parâmetros físico-químicos.

3.6.1- Determinação de potencial zeta, índice de polidispersão e tamanho de gotícula.

A avaliação desses parâmetros ocorreu pela análise de espalhamento dinâmico de luz, utilizando o equipamento Nanotracs (Nanotracs Wave Model MN401) configurado com ângulo de dispersão de 90° sob temperatura constante de 25°C.

3.6.2- Valores de condutividade elétrica.

Foi utilizado um medidor digital de condutividade (mCA 150: MS TECNOPON Instrumentation, Brasil) calibrado por uma solução de condutância de 1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$ em 25 °C para mensurar os valores de condutividade elétrica.

3.7- Atividade Antimicrobiana

3.7.1- Produtos testados e antimicrobianos

Para os ensaios antimicrobianos os produtos teste selecionados foram o OECC, microemulsões MOECC 5%, MOECC 4%, MOECC 3% e MOECC 2%, além da Microemulsão Branca (MEB).

Visando a solubilização do OECC, foi realizada uma etapa de diluição, utilizando como diluente uma solução preparada utilizando Tween® (1%), Dimetilsulfóxido (3%), e água destilada. Após a diluição foi possível a obtenção do produto teste na concentração de 2048 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Como controle positivo de inibição de crescimento foram utilizados os antimicrobianos: Ampicilina, Anfotericina e Polimixina B. Tanto a ampicilina quanto a anfotericina B foram diluídos em água destilada estéril para obter-se uma concentração final de 2048 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.7.2- Meios de cultura

Afim de monitorar o crescimento das cepas bacterianas, caldo Mueller Hinton e o Ágar Mueller Hinton foram utilizados. Para proporcionar o crescimento das leveduras foi utilizado tanto o caldo quanto o ágar mueller hinton suplementado com 2% de glicose

3.7.3-Microorganismos

Para o presente estudo foram selecionadas as cepas bacterianas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 33951, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Além destas, foi selecionada uma cepa de levedura identificada como *Candida albicans* ATCC 90028. Todos os microrganismos estavam estocados no Setor de Microbiologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Estadual da Paraíba (LAC/UEPB).

3.8.4-PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

O processo de inoculação dos microorganismos foi realizada seguindo as recomendações propostas nos documentos M100 (CLSI, 2019) e M27 (CLSI, 2017), para bactérias e leveduras respectivamente, do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). Partindo de uma cultura de 24 horas, colônias foram inoculadas em uma solução salina 0,85 % estéril, a fim de obter uma suspensão de turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala *McFarland*, o equivalente a cerca de $1,0 \times 10^6$ a $5,0 \times 10^6$ unidades formadoras de colônia/mL (UFC/mL) para a levedura e $1,5 \times 10^8$ UFC/mL para as bactérias, estas suspensões foram identificadas como suspensão 1. Em seguida, foi preparada uma suspensão microbiana diluída em meio de cultura apropriado, a fim de obter uma concentração de $5,0 \times 10^3$ UFC/mL para a levedura e $1,5 \times 10^5$ UFC/mL para as bactérias, estas suspensões foram identificadas como suspensão 2.

3.8.5-Atividade Antimicrobiana por cavidade-poço.

Para determinar a atividade antimicrobiana por cavidade-poço foram utilizadas placas de Petri, contendo Ágar MH. A suspensão 1 preparada conforme item acima, foi semeada na superfície do Ágar com auxílio de *swab* estéril, a fim de obter um crescimento confluyente. Após o semeio foram realizados cortes no Ágar, em forma de círculo, com auxílio de uma ponteira estéril, com diâmetro de cerca de 6 mm. Em seguida, 50 µL dos produtos testados nas concentrações descritas dos antimicrobianos como controle de inibição e a solução diluente do óleo essencial (composta por Tween80®, Dimetilsulfóxido (DMSO) e Água destilada) foi adicionada aos poços.

As placas com semeio bacteriano foram incubadas a 37 °C por 24 horas e as placas com semeio de levedura foram incubadas a 35 °C por 24 horas. Após a incubação, a leitura foi realizada pela presença de inibição dos crescimentos ao redor do poço e os halos de inibição foram medidos com auxílio de um paquímetro. Os resultados foram expressos em milímetros (mm) da medida de halo de inibição ao redor da cavidade poço que continha os produtos testados.

3.7.6- Atividade antimicrobiana por microdiluição em caldo – Determinação da Concentração inibitória mínima e Concentração bactericida/fungicida mínima.

A concentração inibitória mínima (CIM) dos produtos e dos antimicrobianos foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, seguindo as preconizações dos

documentos M100 e M27 do CLSI com modificações, para bactérias e leveduras respectivamente. Para isso foram realizadas diluições seriadas em meio, visando a obtenção de concentrações que variaram de 1024 a 8 µg/mL. Após a etapa de preparo das soluções a serem utilizadas, 100 µL destas foram distribuídos nos poços de microplacas de 96 poços. Em seguida, foram inoculados em cada poço 100 µL da suspensão 2 padronizada, preparada conforme descrito acima, obtendo concentração de $2,5 \times 10^3$ UFC/poço para a levedura e 0,5 a $1,0 \times 10^5$ UFC/poço para as bactérias. Foram utilizados controle de crescimento (Meio de cultura + microrganismo) indicando crescimento total (100 %), controle do diluente e um controle de esterilidade do meio de cultura. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas para leveduras e 37 °C por 24 horas para as bactérias, após período de incubação uma alíquota de 10 µL foi semeada em placas de Ágar apropriado para o microrganismo, com auxílio de uma pipeta automática e as placas incubadas sob as mesmas condições para a avaliação da concentração bactericida mínima (CBM) e da concentração fungicida mínima (CFM).

A inibição do crescimento foi analisada conforme recomendações dos documentos do CLSI M27 e M100, avaliando o crescimento em caldo comparado a um controle de crescimento positivo sem tratamento. Para possibilitar a comparação, após a semeadura, foram adicionados 10 µL de resazurina 0,001% em cada poço. Poços que apresentavam coloração azul indicam a inibição do crescimento microbiano, enquanto que a cor rósea indicam a ausência de inibição dos microorganismos pelos produtos testados. (MARTIN, 2003)

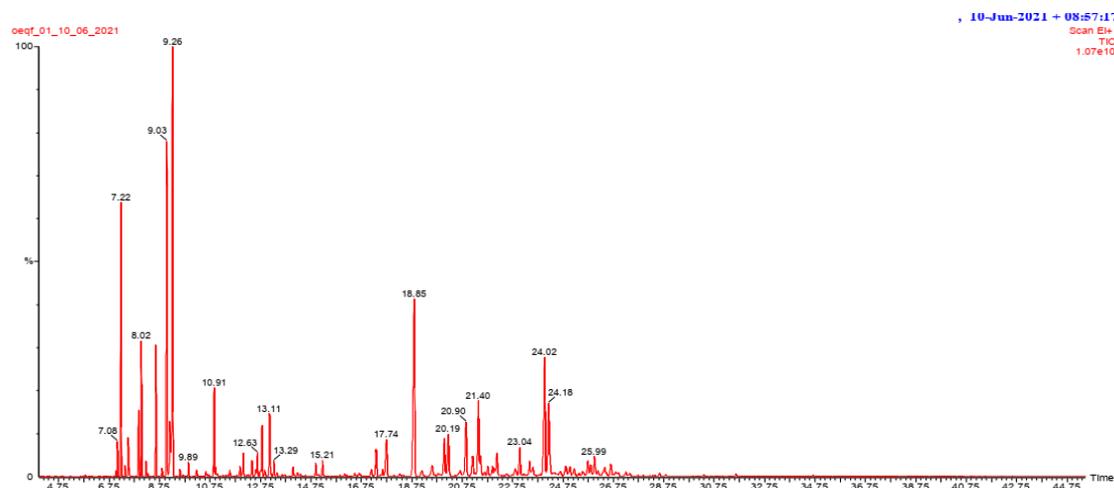
A CIM, CBM e CFM foram definidas como as menores concentrações dos produtos testados e dos antimicrobianos que inibiram o crescimento dos microrganismos ensaiados.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Identificação dos constituintes químicos de *C. conduplicatus*.

Os cromatogramas obtidos evidenciaram a presença de 74 picos distintos, dos quais 71 deles foram identificados, correspondendo a 95,94% dos compostos químicos. A identificação foi realizada comparando os espectros de massas obtidos pelo com os disponíveis na biblioteca virtual NIST 08. A figura 4 mostra o cromatograma obtido.

Figura 4: Cromatograma revelando a presença dos picos presentes no OECC.



Fonte: o autor

Os espectros obtidos revelaram a presença majoritária dos monoterpenos: Eucaliptol (13,145%), *p*-cimeno (10,675%), e dos sesquiterpenos cariofileno (9,7331%), como pode ser visto na tabela 3, que evidencia os compostos químicos identificados no OECC. Os resultados obtidos entram em contraste com os encontrados nas literaturas consultadas.

Tabela 3: composição química das folhas do OECC analisada por CG-EM

N°	Nome	T.R	Área (%)	N°	Nome	T.R	Área (%)
1	α - tricicleno	7,019	0,0947%	37	α –copaeno	17,333	1,1905%
2	α -thujeno	7,076	0,5708%	38	β -bouborneno	17,606	0,2048%
3	α -pineno	7,216	4,9312%	39	β –elemeno	17,739	1,9192%
4	1- Etilbutilhidroperóxido	7,380	0,2080%	40	Cariofileno	18,848	9,7331%
5	Camfeno	7,504	0,7277%	41	β –copaeno	19,155	0,3110%
6	4-tujeno	7,916	1,2496%	42	α -feruleno	19,558	0,6161%
7	β -pineno	8,024	2,7718%	43	Humuleno	20,052	1,7674%
8	β - mirceno	8,211	0,3253%	44	Aloadendreno	20,195	1,9932%

9	2,3- dihidro- 1,8- cineol	8,271	0,0524%	45	β -gurjuneno	20,676	0,2695%
10	α -felandreno	8,604	3,0767%	46	D-gamacreno	20,901	2,6389%
11	α -terpineno	8,848	0,2022%	47	β - Seline	21,171	0,8670%
12	P-cimeno	9,035	10,675%	48	Biciclo germacreno	21,402	3,3999%
13	D-limoneno	9,155	1,5112%	49	α -Muruleno	21,481	0,7182%
14	β -tujeno	9,196	0,6914%	50	Eremofila-1(10),8,11 trieno	21,649	0,1580%
15	Eucaliptol	9,263	13,145%	51	β -germacreno	21,766	0,4158%
16	β -ocimeno	9,554	0,1820%	52	γ -cadieno	21,953	0,4333%
17	γ -terpineno	9,893	0,3961%	53	β -cadineno	22,131	1,0416%
18	Cis-4-tujanol	10,216	0,1809%	54	Cadala-1(10)3,8-trieno	22,863	0,4817%
19	Isoterpinoleno	10,587	0,1605%	55	Ciclohexano,1,3-diisopropenil- metil	23,037	1,3389%
20	Linalol	10,910	2,3936%	56	β -germacreno	23,430	0,6324%
21	Cis-4-tujanol	10,977	0,1832%	57	Cis- α -copaeno-8-ol	23,563	0,5110%
22	cis-2-metenol	11,538	0,1727%	58	Espatuleno	24,019	6,3595%
23	Trans-pinocarveol	11,977	0,3306%	59	Ledol	24,853	0,5042%
24	d-2-canfanona	12,070	0,7481%	60	1,2 epoxihumuleno	25,024	0,4319%
25	pinocarvona	12,406	0,4545%	61	β -guaieno	25,192	0,4382%
26	Terpineol	12,571	0,2259%	62	γ -malieno	25,388	0,1182%
27	Borneol	12,631	0,6743%	63	Epicubebol	25,528	0,2556%
28	Terpinen-4-ol	12,809	1,4399%	64	β -espatulenol	25,734	0,5956%
29	p-cimenol	12,923	0,1932%	65	11,11-dimetil-4,8-biciclodimetilenoundecan-3-ol	25,848	0,3415%
30	α - terpinol	13,110	1,9567%	66	10-epi- α -cadinol	25,933	0,8824%
31	Cis-sabinol	13,290	0,4026%	67	Aloaromadendrano-4- β ,10 - α -diol	26,133	0,1516%
32	Cis-piperitol	13,404	0,0858%	68	Epi- α -murolol	26,399	0,7203%
33	Acetato de β sabinila	14,038	0,2238%	69	Xantoxilina	26,646	0,6456%
34	Acetato de bornila	14,944	0,3624%	70	(1R,7S,E)-7-isopropil-4,10-dimetileno-ciclododec-5-enol	27,255	0,1352%
35	Timol	15,214	0,5278%	71	Aromadendreno	28,582	0,1440%
36	Ciclosativeno	17,153	0,3395%				

Oliveira-Júnior *et al* (2021) relata que no O.E das folhas frescas do *C. conduplicatus* coletados em Petrolina/ PE, foi obtido por hidrodestilação utilizando aparato de *clevenger* simples, foram avistados 50 picos, dos quais 42 foram identificados via CG-MS e dentre eles, os majoritários foram: o Eucaliptol (21,42%) e o p-cimeno (12,41%) e o espatulenol (15,47%).

Almeida *et al* (2015) relatam que OECC das folhas frescas coletadas no cidade de Petrolina/PE durante período de estiagem e obtidos por hidrodestilação com aparato de *clevenger*, revelaram a presença de 58 picos, dos quais 48 foram identificados, podendo se

determinar a presença majoritária do Eucaliptol (17,59 %), p- cimeno (14,38%) e Espatulenol (13,38 %), enquanto as folhas que passaram pelo mesmo procedimento e foram coletadas em período chuvoso apresentaram como majoritários o Eucaliptol (17,81%), α -felandreno (11,39 %) e o Biciclogermacreno (8,26 %).

A diferença na quantidade total e na quantidade relativa de compostos presentes entre o presente estudo e os dados encontrados na literatura pode estar relacionado a uma gama extensa de fatores. Podem ser citados o local de coleta, a época do ano em que foram coletadas e suas condições climáticas, as características do solo e também o fato das folhas utilizadas neste estudo terem sido submetidas a um processo de secagem e de pulverização, enquanto os exemplares citados na literatura não foram submetidos a este mesmo procedimento.

4.2- Determinação de potencial Zeta, índice de polidispersão e tamanho de gotícula.

O potencial zeta é um parâmetro que corresponde a estabilidade do sistema disperso. As gotículas são formadas por camadas, e a mais interna (camada de Stern) possui cargas contrárias as da camada externa, o que gera uma tensão em sua interface que pode ser mensurada por aparelhos, usando modelos teóricos. Alguns autores defendem que os valores ideais são maiores de 25 mV ou menores que -25 mV (REIS, 2017). Porém, apenas a medida do potencial zeta não pode ser totalmente confiável nesse aspecto, uma vez que não levam em conta o modelo experimental e podem sofrer variações dependendo do tipo de tensoativos utilizados. (HONARY & ZAHYR, 2013; CALLENDER *et al.*, 2017.) O sistema elaborado neste estudo apresentou-se como estável, uma vez que não sofreu o processo de coalescência, e os valores obtidos estão dispostos na tabela 4.

O tamanho de gotícula é uma característica crucial e diferenciadora das microemulsões. Caracteristicamente apresentam gotículas de tamanho entre 10 – 300 nm, o que acarreta na formação de um sistema translúcido e termodinamicamente estável (DAMASCENO *et al.*, 2011). A avaliação do tamanho das gotículas revelou valores variáveis entre as microemulsões, eles eram compreendidos entre 17,07 nm e 15,64 nm. Esses resultados explicitados na tabela 4, estão de acordo com a literatura consultada e constata a alta estabilidade do sistema formulado.

O índice de polidispersão relaciona-se com o grau de uniformidade do tamanho das gotículas que constituem o sistema disperso. Quanto mais próximo de zero for o valor, maior a homogeneidade do sistema (MOGHIMIPOUR, SALAMI & EFTEKHARI, 2013). Os valores de I.P.D para todas as amostras apresentaram valores abaixo de 0,07, indicando homogeneidade e estabilidade, como explicitado na tabela 4.

Tabela 4: Valores de potencial zeta, tamanho de gotícula e índice de polidispersão.

Nome	P.Z (mV)	T.Got (nM)	I.P.D
MEB	1,57± 0,47	17,07± 0,03	0,055± 0,01
MOECC-2%	2,24± 0,57	15,64± 0,06	0,036± 0,01
MOECC-3%	7,51± 1,45	16,13± 0,18	0,064± 0,02
MOECC-4%	1,29± 0,83	16,04± 0,11	0,038± 0,01
MOECC-5%	0,83± 0,72	16,87± 0,15	0,036± 0,01

Legenda: PZ= Potencial Zeta; T.Got= tamanho de gotícula; I.P.D= Índice de Polidispersão

4.3- Valores de condutividade elétrica

Os índices de condutividade elétrica comumente são utilizados para identificar e diferenciar os tipos de microemulsão existentes. Dentre os componentes comumente utilizados como fase aquosa, a água apresenta-se como um ótimo condutor de íons, portanto, quanto maior a quantidade de água, maior o valor de condutividade. Elevados índices de água geram diferentes tipos de microemulsão, e ainda, podem provocar fenômenos de transição entre sistemas bicontínuos, óleo em água e água em óleo. (CALLENDER *et al.*, 2017; FROELICH *et al.*, 2017). Os valores de condutividade obtidos (tabela 4) corroboram com a quantidade de água presente nas amostras e sugerem que se trata de uma microemulsão O/A

Tabela 5: Valores de condutividade elétrica expressos em $\mu\text{S}/\text{cm}^3$.

Nome	Condutividade
Branco	156,33±0,22 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$
MOECC-2%	154,16±2,62 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$

MOECC-3%	156,90±0,87 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$
MOECC-4%	163,70±3,20 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$
MOECC-5%	157,30±1,05 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$

4.4- Atividade antimicrobiana

4.4.1-Atividade antimicrobiana por cavidade- poço.

Por essa metodologia não foi possível observar a presença da formação de halos. Tal fato pode ter ocorrido pela não difusão dos produtos testados no meio de cultura, não favorecendo a interação entre as cepas e os produtos.

4.4.2- Atividade antimicrobiana por microdiluição em caldo – Determinação da Concentração inibitória mínima e Concentração bactericida/fungicida mínima

Todas as concentrações das microemulsões apresentaram atividade frente a cepa de *S.aureus ATCC 25923*, como evidenciado na tabela 6, mostrando que ela pode ser um possível candidato a uma formulação farmacêutica que atue como nanocarreador. Essa atividade não foi revelada pela adição do corante resazurina aos micropoços, porém, foi identificada posteriormente nas placas em que foram semeadas. Vale salientar que na microemulsão branca houve crescimento microbiológico, indicando que ela não interfere no crescimento dos microrganismos testados.

O OECC apresentou uma significativa atividade inibitória frente a cepa de *S. aureus ATCC 25923* apresentando uma CIM de $\geq 256 \mu\text{g}/\text{mL}$ e uma CBM de $\geq 512 \mu\text{g}/\text{mL}$ (tabela 6) Para o *S.aureus ATCC 33951* foi possível observar que concentrações maiores ou iguais a $1024 \mu\text{g}/\text{mL}$ podem levar a inibição ou ao extermínio da cepa.

Tabela 6: resultado da CIM para os produtos testados frente às cepas escolhidas expressos em $\mu\text{g}/\text{mL}$.

	<i>S.aureus</i>	<i>SARM</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>
OECC	$\geq 256 \mu\text{g}/\text{mL}$	$\geq 524 \mu\text{g}/\text{mL}$	R	R	R

MEOCC-5%	S	R	R	R	R
MEOCC-4%	S	R	R	R	R
MEOCC-3%	S	R	R	R	R
MEOCC-2%	S	R	R	R	R
AMP	<8 µg/mL	16 µg/mL	<2 µg/mL	<2 µg/mL	-
ANF	-	-	-	-	< 8 µg/mL
PLM			≤2 µg/mL	≤2 µg/mL	

Legenda: AMP: Ampicilina. ANF: Anfotericina B PLM: Polimixina B. R: Resistente. S: Sensível

A atividade frente a essas cepas Gram-positivas pode estar ligado ao fato de que em sua composição química, pode-se observar a presença majoritária do Eucaliptol e p-Cimeno, compostos químicos que já foram relatados por apresentarem atividades microbiológicas. A ausência atividade frente às cepas Gram-Negativas e à cepa fúngica pode estar relacionada com as características morfológicas de cada espécie.

Há evidências científicas que apontam uma forte atividade bactericida do Eucaliptol contra cepas de *S.aureus*, *E.coli* e *P. aeruginosa*. Foi observado que devido as interações do eucaliptol com outros componentes de óleos essenciais podem diminuir o seu potencial bactericida. Entretanto é comum a observação de efeitos sinérgicos entre esse monoterpene e outros fármacos que já são empregados na terapia antibacteriana atual, sendo um promissor adjuvante terapêutico. (CAI *et al.*, 2020). A falta de atividade frente a cepas de *E.coli* e *E. aeruginosa* no presente estudo pode ter ocorrido devido à baixa quantidade relativa dessa substância no OECC.

Devido à grande procura por novos agentes terapêuticos que apresentem atividade antimicrobiana, os compostos purificados provenientes de óleos essenciais como o p-Cimeno, apresentam-se como potenciais adjuvantes terapêuticos, uma vez que conseguem inibir o crescimento de uma gama variada de microrganismos (Balahbib *et al.*, 2021). Através da técnica de microdiluição em caldo, foi possível observar que frente à cepa de *S.aureus ATCC 25923* que o p-Cimeno apresentava uma CIM de 128 µg/mL e uma capacidade bactericida mínima 1024 µg/mL. Ainda foi observado o efeito sinérgico entre a tetraciclina e este monoterpene frente a mesma cepa. (MILADI *et al.*, 2017)

Os resultados citados corroboram com o presente estudo, indicando que pode haver uma potencial relação sinérgica entre os componentes majoritários do OECC resultando na inibição do crescimento da cepa de *S.aureus ATCC 25923*.

5-Conclusão

Com este estudo realizado foi possível identificar a grande maioria dos compostos que fazem parte do OECC, e ainda, definir os majoritários. Além disso, foi possível realizar a formulação de sistemas microemulsionados e avaliar parâmetros físico-químicos, que fornecem novas perspectivas para a sua aplicação junto ao OECC. A atividade antimicrobiana apresentou resultados satisfatórios tanto para as microemulsões quanto para o OEQF frente à cepa de *S. aureus ATCC 25923*.

6- Referências:

- ABREU, IN & MAZZAFERA, P. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.43, n.3, p. 241-8, 2005
- ALCANTARA, S. SISTEMAS MICROEMULSIONADOS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE LIPPIA GRACILIS: Obtenção , Caracterização e Potencial Ação Amebicida ESSENCIAL DE LIPPIA GRACILIS : Obtenção ,. 2016.
- AMINOV, R. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochemical pharmacology*, n.133, p: 4-19, 2017
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARBOSA, Antonio Junior Costa. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Croton urticifolius* LAM. e *Croton adamantinus* MÜLL. ARG. (EUPHORBIACEAE). 2021. 70f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química - PPGQ) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2021.
- BARROS, A. R. A. Desenvolvimento, caracterização e atividade antifúngica de microemulsões O/A contendo anfotericina B. 2013. 48f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.
- BERNARDS, M. A. Plant natural products: A primer. **Canadian Journal of Zoology**, v. 88, n. 7, p. 601–614, 2010.
- BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature**, v.529, n.7586, p: 336-343, 2016.
- CARTAXO, Sarahbelle Leitte; DE ALMEIDA SOUZA, Marta Maria; DE ALBUQUERQUE, Ulysses Paulino. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326-342, 2010.
- CAI, Z.-M., PENG, J.-Q., CHEN, Y., TAO, L., ZHANG, Y.-Y., Fu, L.-Y., ... Shen, X.-C. (2020). 1,8-Cineole: a review of source, biological activities, and application. **Journal of Asian Natural Products Research**, 1–17. doi:10.1080/10286020.2020.1839432
- CASTRO, L. C.; SAUTER, I. P.; ETHUR, E. M.; KAUFFMANN, C.; DALL'AGNOL, R.; SOUZA, J.; CIBULSKI, S. P.; MUNIZAW; WEIDLICH, L.; LOHMANN, P. M.; ROEHE, P. M.; GERMANI, J. C.; ROTT, M. B.; VAND DER SAND, S. T. *In vitro* effect of *Acanthospermum australe* (Asteraceae) extracts on *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 15, n. 4, p. 589-594, 2013.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2017) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard-fourth edition. **CLSI document M27- A4**.Wayne, PA

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In: CLSI supplement M100. 29th ed. Wayne PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2019.

CORDEIRO, I.; S., R.; CARNEIRO-TORRES, D.S.; L., L.R. DE; CARUZO, M.B.R.; BERRY, P.; RIINA, R.; SILVA, O.L.M.; SILVA, M.J. DA; SODRÉ, R.C. 2015 *Croton* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17545>. Acesso em: 15 de mar. 2022

CRUZ, W. S.; FERRAZ, A. C.; LIMA, W. G.; MORAES, T. F. S.; FERREIRA, F. L.; FERREIRA, J. M. S.; De MAGALHÃES, J. C.; DUARTE, L. P.; VIEIRA-FILHO, S. A.; MAGALHÃES, J. C.. Evaluation of the activity of *Tontelea micrantha* extracts against bacteria, *Candida* and Mayaro virus. **Journal of Pharmaceutical Negative Results**, 9(1), p. 21-26, 2019.

DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, E. E.; SILVEIRA, W. L. L.; ARAÚJO, I. B.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 32, n. 1, p. 9-18, 2011.

FREITAS, P. R. et al. GC-MS-FID and potentiation of the antibiotic activity of the essential oil of *Baccharis reticulata* (ruiz & pav.) pers. and α -pinene. **Industrial Crops and Products**, 58 v. 145, p: 1-5, 2020.

GOMES, D. A. de A. **Aplicação de Microemulsões na Solubilização de Frações Pesadas de Petróleo**. 2009. 124f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

GOMES, F. do E. S. **Obtenção de Sistemas Microemulsionados e Estudo de Simulação por dinâmica Molecular de Sistemas Micelares objetivando a veiculação de produtos bioativos**. 2010. 172f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

GUERRA JÚNIOR, J. I.; FERREIRA, M. R. A. .; OLIVEIRA, A. M. de .; SOARES, L. A. L. . *Croton* sp.: a review about Popular Uses, Biological Activities and Chemical Composition. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. e57311225306, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i2.25306. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/25306>. Acesso em: 02 mar. 2022.

MARTIN, A.; CAMACHO, M.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J. C. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 47, n. 11, p. 3616–3619, 2003.

MEHRA, NEELESH KUMAR; JAIN, KEERTI; JAIN, NARENDRA KUMAR. Pharmaceutical and biomedical applications of surface engineered carbon nanotubes. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 6, p. 750-759, 2015.

MÉRILLON, JEAN-MICHEL; RIVIERE, CÉLINE (Ed.). **Natural antimicrobial agents**. Cham, Switzerland: Springer, 2018.

MONTENEGRO, L., LAI, F., OFFERTA, A., SARPIETRO, M. G., MICICCHE, L., MACCIONI, A. M., ... & FADDA, A. M. From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics. **Journal of drug delivery science and technology**, v. 32, p. 100-112, 2016.

MILADI, H., ZMANTAR, T., KOUIDHI, B., AL QURASHI, Y. M. A., BAKHROUF, A., CHAABOUNI, Y., ... CHAIEB, K. Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymene and γ -terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. **Microbial Pathogenesis**, 112, 156–163. doi:10.1016/j.micpath.2017.09.057

MUKHERJEE, R., SAHA, M., ROUTRAY, A., & CHAKRABORTY, C. Nanoscale surface characterization of human erythrocytes by atomic force microscopy: a critical review. **IEEE transactions on nanobioscience**, v. 14, n. 6, p. 625-633, 2015

MURRAY, CHRISTOPHER JL *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, 2022

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

OLIVEIRA, Diogo Gallo. A família Euphorbiaceae Juss. em um fragmento de Caatinga em Sergipe. **Scientia Plena**, v. 9, n. 4, 2013.

OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M., PESSOA, R. T., FERNANDES, M. N. M., ALCÂNTARA, I. S., DA SILVA, B. A. F., DE OLIVEIRA, M. R. C., MENEZES, I. R. A. Anti-inflammatory and anti-edematogenic action of the *Croton campestris* A. St.-Hil (*Euphorbiaceae*) essential oil and the compound β -caryophyllene in *in vivo* models. **Phytomedicine**, v. 41, p. 82-95, 2018.

PALMEIRA, J.R.S.F.; ALVES, V.L.; MOURA, F.S.; VIEIRA, L.F.A.; COSERVA, L.M.; LEMOS, R.P.L. Constituintes químicos das folhas de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol.16, n.3, p.397-402, 2006.

PEREIRA, W. F. Avaliação do potencial citotóxico, antifúngico e antibacteriano do extrato etanólico das folhas de *Croton conduplicatus* Kunth, em modelos experimentais *in vitro*. 2019. 83 p. Dissertação (Mestrado Profissional em Farmacologia Clínica) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

Ravanelli, N., Santos, K. P., Motta, L. B. D., Lago, J. H. G., & Furlan, C. M. Alkaloids from *Croton echinocarpus* Baill.: anti-HIV potential. **South African Journal of Botany**, v. 102, p. 153-156, 2016.

REGNAULT-ROGER, C., VINCENT, C., & ARNASON, J. T. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. **Annual review of entomology**, v. 57, p. 405-424, 2012.

ROSSI, C. G. F. T.; DANTAS, T. N. de C.; DANTAS NETO, A. A.; MACIEL, M. A. M. Microemulsões: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial.

Revista de Ciências Exatas e da Terra, Seropédica/RJ, v. 26, n. 1-2, p. 45-66, jan. / dez. 2007.

Rocha, R. R.; Matos, M. N. C; Guerrero, J. A. P; Cavalcante, R. M. B; Melo, R. S.; Azevedo, Á. M. A., & Carneiro, V. A. Comparative study of the chemical composition, antibacterial activity and synergic effects of the essential oils of *Croton tetradenius* baill. And *C. pulegioides* baill. Against *Staphylococcus aureus* isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 156, p. 104934, 2021.

SECCO, RICARDO. Panorama dos recentes estudos taxonômicos em *Euphorbiaceae* sl no Brasil. **Rodriguésia-Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 63, n. 1, 2012.

SILVA, M. O.; AQUINO, S. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, 8(4), p. 472-482, 2018

SHARIFI-RAD, J., SUREDA, A., TENORE, G. C., DAGLIA, M., SHARIFI-RAD, M., VALUSSI, M& IRITI, M. Biological activities of essential oils: From plant chemocology to traditional healing systems. **Molecules**,v. 22, n.1, p: 70. 2017.

SHIN, J.; PRABHAKARAN, V.S.; KIM, K. The multi-faceted potential of plant-derived metabolites as antimicrobial agents against multidrug-resistant pathogens. *Microbial pathogenesis*, n.116, p: 209-214, 2018

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TRINDADE, MJ de S.; LAMEIRA, Osmar Alves. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2014. WORLD HEALTH ORGANIZATION .Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2021. 2021.

ZAPPI, D. Fitofisionomia da Caatinga associada à Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1-2, p. 34-38, 2008.

